

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-165591

(43)Date of publication of application : 11.06.2002

(51)Int.Cl.

C12N 7/02
A61K 35/14
C12Q 1/70

(21)Application number : 2001-143037

(71)Applicant : JSR CORP

(22)Date of filing : 14.05.2001

(72)Inventor : KATAYOSE SATOSHI
HAN KAKUN
MURATA MITSUHIRO
HIKATA MIKIO

(30)Priority

Priority number : 2000289835 Priority date : 25.09.2000 Priority country : JP

(54) MAGNETIC PARTICLE AND METHOD FOR USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a material capable of specifically capturing a virus and utilizable for separation, concentration and detection of the virus and to provide a method for using the material.

SOLUTION: This magnetic particle has a lectin bindable to the surface layer of the virus on the surface and 0.05-10 μm particle diameter.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

B2

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-165591
(P2002-165591A)

(43) 公開日 平成14年6月11日 (2002.6.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
C 1 2 N 7/02		C 1 2 N 7/02	4 B 0 6 3
A 6 1 K 35/14		A 6 1 K 35/14	Z 4 B 0 6 5
C 1 2 Q 1/70		C 1 2 Q 1/70	4 C 0 8 7

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 4 頁)

(21) 出願番号	特願2001-143037 (P2001-143037)	(71) 出願人	000004178 ジェイエスアール株式会社 東京都中央区築地2丁目11番24号
(22) 出願日	平成13年5月14日 (2001.5.14)	(72) 発明者	片寄 聡 東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内
(31) 優先権主張番号	特願2000-289835 (P2000-289835)	(72) 発明者	范 可君 東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内
(32) 優先日	平成12年9月25日 (2000.9.25)	(72) 発明者	村田 充弘 東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内
(33) 優先権主張国	日本 (J P)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 磁性粒子およびその使用方法

(57) 【要約】

【課題】 ウィルスを特異的に捕捉し、ウィルスの分離、濃縮、検出に利用できる材料及び使用方法を得る。

【解決手段】 ウィルス表層に結合することのできるレクチンを表面に有する粒径が $0.05\mu\text{m}$ ~ $10\mu\text{m}$ の磁性粒子。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ウィルス表層に結合することのできるレクチンを表面に有する粒径が $0.05\mu\text{m}\sim 10\mu\text{m}$ の磁性粒子。

【請求項2】 レクチンがマンノース結合型であることを特徴とする請求項1記載の磁性粒子。

【請求項3】 マンノース結合型レクチンがコンカナバリンAである前記請求項2の磁性粒子。

【請求項4】 請求項1記載の磁性粒子とウィルスを含む可能性のある試料とを接触させ、ウィルスを粒子表面に結合させることを特徴とするウィルスの吸着方法。

【請求項5】 請求項4記載の方法で磁性粒子に結合させたウィルスを試料から除去することを特徴とする試料からのウィルス除去方法。

【請求項6】 請求項4記載の方法で磁性粒子に結合させたウィルスを試料から分離し、収集することを特徴とするウィルスの濃縮方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、ウィルスの特異的に捕捉し、ウィルスの分離、濃縮、検出に利用できる材料及び使用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】従来のウィルス濃縮法の代表例としては超遠心法が挙げられるが、高価な機器、長い分離時間及び熟練作業員を要し、かつ同時に多数の検体を処理することは困難であり簡便な方法とは言い難い。また、B型肝炎ウイルス表面抗原(HBs抗原)がヘパリンと結合する性質から、ヘパリンセファロース担体によるクロマトグラフィー法も報告されているが、これも同時に多数の検体を処理することは困難である。その他、硫酸アンモニウムやポリエチレングリコール、ポリアニオンと2価イオンの組み合わせ等によりウィルスを沈殿させる方法があるが、混合する試薬にPCR阻害がある等の問題からウィルスの沈殿分離後の試料精製が必要であるという難点があった。一方、ウィルス感染の危険性を排除する方法として、ウィルス含有試料の使用に際して、フィルターなどによってウィルスを排除して使用方法が提案されている。そのような目的で使用される材料として、ウィルスに親和性を有するレクチンを結合して、ウィルスを選択的に排除するフィルターや微粒子がある(特開平10-45601)。また、レクチン固定アフィニティークロマトカラムも市販されているが、これらのフィルター、カラム方式がバッチ法に比べて、回収されるウィルス濃度が一般的に低い、ウィルス検出の用途に改良を要する。その他、カラム法の処理時間がバッチ方式に比べて長く、操作も他段階のため、自動化の実現に制限要因が多い。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、上記の問題点を解決し、ウィルスを選択的に吸着でき、かつその後の処理が簡便に行うことができる磁性粒子ならびにこの磁性粒子の使用方法を提供するものである。

【0004】

【発明を解決するための手段】本発明者らは研究の結果、上記課題を解決する手段として、次の磁性粒子および濃縮方法を開発するに到った。即ち、本発明は、マンノース結合型レクチンを表面に有する磁性粒子(以下、「磁性粒子」という)を提供する。また、本発明は、第二に、ウィルス含有試料に上記の磁性粒子とを接触させ、ウィルスを前記粒子に結合させる操作、次にこうしてウィルスが結合した前記粒子を試料から分離、収集する操作を含む、ウィルス濃縮、検出方法を提供する。

【0005】

【発明の実施の形態】本発明の磁性粒子はポリマー粒子内部に磁性体を含有するものである。このような磁性体は、例えば四三酸化鉄(Fe_3O_4)、 γ -重三酸化鉄($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)等の各種フェライト、鉄、マンガ、コバルト、クロムなどの金属またはこれら金属の合金などを用いることができる。本発明の磁性粒子に使用する磁性体のサイズが20nm以下であることが好ましい。20nm以上になると、残留磁化の影響が現れ、磁場を取り除いた後でも、磁性粒子同士の相互結合が残り、粒子分散性、及びウィルス抽出効率に影響を与えるので、好ましくない。この磁性体は粒子の内部のみに含有され、粒子表面に露出していないことが好ましい。

【0006】磁性体の含有量は、磁性粒子全体に対し10重量%以上、特に20~90重量%であることが好ましい。ここで、磁性体含有量が少なすぎると、磁性粒子に良好な磁気分離性が得られず、その結果、後述するウィルスの分離・濃縮方法において、血液または体液等の検体から磁性粒子を分離するために相当に長い時間を要するので、高い時間的効率が得られないことがあり、好ましくない。

【0007】本発明の磁性粒子の粒径は、特に制限されるものではないが、通常 $0.08\mu\text{m}\sim 300\mu\text{m}$ 、好ましくは $0.1\mu\text{m}\sim 100\mu\text{m}$ である。粒径が $0.08\mu\text{m}$ 未満になると、磁気分離に要する時間が長くなるので好ましくない。また、粒径が $300\mu\text{m}$ を越える場合は、一定質量当たりの粒子表面積が少なくなり、固定化されたレクチン量も比例して減少するため、ウィルスを捕獲する効率の低下を引き起こすので好ましくない。本発明の磁性粒子の粒子形状は球状である必要はなく、異形粒子であってもかまわない。なお球状でない粒子の粒径としては、それぞれの粒子の最長径と最短径との平均値をとるものとする。

【0008】本発明品の磁性粒子は、以下の方法によって調製することができる。

(a) 高分子を構成するモノマーを含む重合成分に磁性体を混合して重合を行う。重合方法としては、通常の高

分子水分散体を得る方法が使用でき、乳化重合、懸濁重合、分散重合などが挙げられる。

(b) 高分子を構成するモノマーを含む重合成分を通常の高分子水分散体を得る方法で重合し、高分子水分散体を得る。この粒子表面に磁性体層を形成する。

(c) 高分子を実質的に水不溶で水より沸点の低い溶媒に溶解し、磁性体をこの溶液に分散する。これを適当な乳化剤ないしは分散剤を用いて水に分散させ、溶媒を蒸留により除去する。

(d) 上記の(a)、(b)または(c)で得られた高分子水分散体をシードとしてモノマーを添加して重合し、粒子表面に高分子層を形成する。

本発明品の磁性粒子が非多孔質であることが好ましい。多孔質粒子の場合、レクチン固定、およびウイルス抽出に当たり、細孔中の反応と粒子表面での反応速度が極端に異なるため、再現性の良い結果が得られないことがある。

【0009】本発明において、ウイルス表層に結合することのできるレクチンとしては、ウイルス表層に存在することが多いマンノース結合型レクチンを用いることが好ましい。本発明に使用されるマンノース結合型レクチンは、主としてアスパラギン結合糖鎖の母核の構成糖である α -マンノシル残基を認識するレクチンであり、ConA (*Conavalia ensiformis* (ConA)), Lens culinaris (LCA), Bowringia midbraedii (BMA), Dolichos lablab (DLA), Galanthus nivalis (GNA), Gerardia savaglia (GSL), Machaerium biovulatum (MBA), Machaerium lunatus (MLA), Narcissus pseudonarcissus (NPA), Epipactis heleborine (EBA), Listera ovata (LOA) などがある。機能及び経済性の面から、マンノース結合型レクチンの中でも特に、ConAが好適である。ConAは通常タチナタマメより精製されるものが利用できる。磁性粒子の表面にマンノース結合型レクチン化合物を結合させるには、エポキシ基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、酸クロライド基などの官能基を磁性粒子表面に導入することが好ましく、その方法としては、上記磁性粒子製造時に共重合モノマーとして官能基含有共重合性モノマーを重合させる方法、化学反応により必要な官能基に変換させる方法などがある。それら、活性の官能基にマンノース結合型レクチンを結合させる方法としては、臭化シアン活性化法、カルボジイミド試薬やウッドワード試薬を用いる縮合試薬法、ジアゾニウム化合物を介したジアゾ法、酸アジド誘導体法、ハロゲン化アセチル誘導体法、トリアジニル誘導体法、ハロゲン化メタクリル (アクリル) 酸誘導体法、グルタルアルデヒドや両末端エポキシ化合物のような多官能性の架橋剤を用いる架橋法などいずれも可能であり、粒子表面に直接、あるいはカップリング剤やスペーサーを介して結合させることが出来る。

【0010】このようにして得られるマンノース結合型

レクチン固定磁性粒子は、その分散媒に乳化剤、分散剤、未反応モノマー、水溶性ポリマー、重合開始剤の分解物などを含んでいる場合がある。これらの物質は、例えば医療診断薬に使用した場合、核酸増幅検査段階において反応阻害物となる可能性が高いため、例えばAdv. Colloid Interface Sci., 81, 77~165 (1999) などに示される方法によりマンノース結合型レクチン固定磁性粒子の分散媒から除去することが好ましい。

【0011】マンノース結合型レクチン固定磁性粒子の分散液は、その一定量を試料と混合し、例えば室温で10分程度上下回転のインキュベートにより、試料中のウイルスを結合することができる。本発明品の濃縮対象となるウイルスは、エイズ、B型肝炎、C型肝炎、成人T細胞白血病ウイルス等が挙げられる。また、エボラ出血熱を引き起こすフィロウィルス、腎症候性出血熱を引き起こすハンタウイルス等もその対象になる。これらの個別のウイルス濃縮に状況に応じて適切な緩衝液、キレート剤、または金属イオン等を加えても良い。

【0012】

【実施例】次に、実施例によって本発明を詳細に説明するが、本発明は、これらに限定されるものではない。また、実施例において「部」および「%」は重量換算である。

参考例1

油性磁性流体「フェリコロイドHC50」[タイヨー工業(株)製]にアセトンを加えて粒子を析出沈殿させた後、これを乾燥することにより、親油化処理された表面を有するフェライト系の超常磁性体(粒子径: 0.01 μ m)を得た。ついで、超常磁性体40部にシクロヘキシルメタクリレート95部、メタクリル酸5部、およびベンゾイルペルオキシド(重合開始剤)3部を添加し、この系を混合撹拌することにより超常磁性体を均一に分散させてモノマー組成物を調整した。一方、ポリビニルアルコール10部、ラウリル硫酸ナトリウム0.05部およびポリエチレンオキシドノニルフェニルエーテル0.1部を水1000部に溶解して水分散体を調整した。得られた水性媒体(水相)中に上記のモノマー組成物を添加し、ホモジナイザーで予備撹拌した後、超音波分散機で分散処理することにより平均粒子径が1 μ mの油滴(油相)が水性媒体に分散されてなる懸濁液(油滴分散体)を調整した。次に、得られた懸濁液を容量2リットルの撹拌機付き三つ口フラスコに仕込み、この系を75℃に昇温し、窒素雰囲気下において撹拌しながら5時間にわたり油滴中のモノマーを重合(懸濁重合)させることにより、磁性粒子を製造した。得られた粒子を光学顕微鏡で写真撮影し、粒子200個の直径を計測してその平均を求めた結果、1.2 μ mであった。この磁性ポリマー粒子1g(乾燥重量)を10mlの10mM MES緩衝溶液(pH6)に分散し、水溶性カルボジイミド試薬であるEDC・塩酸塩(1-エチル-3-(3-ジメチ

ルアミノプロピル) カルボジイミドヒドロクロライド) 0.05gを添加し、20℃、1時間反応させた。続けて、0.5%コンカナバリンA(ConA、SIGMA社製)の10mM MES緩衝溶液4mlを添加し、20℃で2時間反応した。遠心操作(5000×g、15分)で磁性粒子を沈殿させ、上澄みの未反応のConAを除いた。この上澄み中のConA量を、PIERCE社製、BCA Protein Assay Reagent Aを用いて、ConAを用いて作製した検量線から定量し、粒子と反応したConA量を求めた結果、粒子1g当たり15mgであった。この粒子を生理食塩水に5重量%となるように再分散した。

【0013】実施例1

HIV-1濃縮能の評価

HIV-1陽性血漿(ウイルス濃度 5×10^6 copies/ml)をHIV-1陰性血漿で段階的に希釈し、ウイルス濃度 5×10^4 copies/ml(試料A)、 5×10^3 copies/ml(試料B)、 5×10^2 copies/ml(試料C)、 5×10^1 copies/ml(試料D)の各試料を調製した。各試料1mlに対して、参考例1で得られた磁性粒子の生理食塩水分散液(5重量%)100μLを添加し、室温で10分間混和してウイルスを粒子に吸着させた。この、ウイルスの吸着した磁性粒子を磁気分離により上澄みと分離し、上澄み1mlを取り除き、磁性粒子の分散液100μL(それぞれ、試料a、b、c、d)を得た。この分散液から市販試薬(スマイテストEX R&D、ゲノムサイエンス研究所)を用いてウイルス核酸を抽出した。ただし、磁性粒子は、ウイルス溶解反応の工程の後に、磁気分離によって取り除いた。対照として、100μLの試料A~DからスマイテストEX R&Dによりウイルス核酸を抽出した。抽出したウイルス核酸の検出と定量は、LightCycler System(ロシュ・ダイアグノスティクス株式会社)を用いて、RT-PCRによる増幅反応を蛍光試薬商品名SYBR green Iによって定量的に検出する方法により行った。増幅の特異性は融解曲線測定による増幅産物の融解温度測定により検定した。RT-PCRにおけるプライマー対の塩基配列は、5'-CCC ACA AGA TTT AAA CAC CA-3'、5'-TGA AGG CTA GTA GTT CC-3'を用いた。ウイルス核酸量の定量は、45回の増幅過程において、増幅産物量に相関して増大する蛍

フロントページの続き

(72)発明者 日方 幹雄

東京都中央区築地二丁目11番24号ジェイエスアール株式会社内

光強度が一定の基準値(Threshold: Th)を越えたサイクル数(Th cycle)を、濃度既知の増幅産物の希釈系列を同時に測定して作製した、DNA量-Th cycleの検量線に外挿して求めた。その結果、ウイルス濃縮磁性粒は $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^1$ copies/mLの幅広い濃度範囲のウイルス陽性血漿を、ウイルスの濃縮効率80%以上で、1/10の体積に濃縮することが出来た(表1)。

【0014】

【表1】

	ウイルス濃度 (検出量) (copies/mL)	濃縮率
試料 A	3.2×10^4	
試料 B	2.6×10^3	
試料 C	2.8×10^2	
試料 D	1.7×10^1	
試料 a	4.6×10^4	濃縮率 9.2 倍
試料 b	5.5×10^3	濃縮率 11 倍
試料 c	4.4×10^2	濃縮率 8.8 倍
試料 d	4.1×10^1	濃縮率 8.2 倍

【0015】

【発明の効果】本発明の磁性粒子は磁性成分を含有し、かつレクチンがその表面に結合されているため、ウイルスを粒子に捕捉させて粒子を磁気で分離することで、非常に簡単にウイルスを濃縮することが可能であることから、元の検体、試料に含まれているウイルスが非常に微量で検出が困難なものであっても、本粒子を用いてウイルスを濃縮することでその検出を確実にすることが出来る。また、その濃縮が磁気分離によって行えることから、多検体を処理する自動濃縮機への適応を容易に図ることが出来る。本発明の磁性粒子は、血液や体液等の検体中のウイルスと特異的に結合し、当該粒子により分離・濃縮されたウイルスを免疫反応、またはウイルスの核酸抽出し、核酸検出する方法等で特定、定量することが出来る。特に核酸増幅法を用いる核酸検出法に本発明品が適する。

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QQ10
QR48 QR50 QR54 QS15 QX02
4B065 AA95X BA22 BA30 BD14
BD22 CA46 CA56
4C087 AA01 AA02 DA06 NA01 ZA51